

SEQ 18, 12

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C07H 21/00

A61K 48/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98102196.4

[43]公开日

[11]公开号

[22]申请日 98.5.29 [21]申请号 98102196.4
[71]申请人 杭州赛麟生物技术开发有限公司
地址 100081 北京市海淀区皂君庙乙7号
[72]发明人 胡前进 梁 昱

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 类胰岛素生长因子受体基因的反义核酸的抑癌作用

[57]摘要

本发明涉及用化学方法合成系列序列特异的反义核酸,其碱基排列顺序与人类 I 型类胰岛素生长因子(IGF-1)受体基因的一段序列互补,这些核酸可在细胞内特异地与人类 I 型类胰岛素生长因子(IGF-1)受体基因的信使核糖核酸(mRNA)杂交,从而阻止人类 I 型类胰岛素生长因子(IGF-1)受体基因的表达,达到抑制肿瘤细胞增长的作用。这些反义核酸可用来发展成为抑制人体肿瘤生长的药物。

ISSN 1008-4274

专利文献出版社出版

权 利 要 求 书

1、一种寡聚反义脱氧核糖核酸 (DNA) 或核糖核酸 (RNA), 其特征在于可特异性结合人类 I 型类胰岛素生长因子 (IGF-1) 受体基因的不同区域, 所述反义核酸序列选自

(1). PAC80: 5' -TTA TTT GGG ATG AAA TTC CC-3'

(2). PAC81: 5' -GGA GCC AGA CTT CAT TCC TT-3'

~~(3). PAC83: 5' -TCG AGG ATG AGG GAG CAG TC-3'~~

(4). PAC84: 5' -TGA GCA AAT TGC CCT TGA AG-3'

(5). PAC85: 5' -CTC CAT GCG GTA AAT TTC GG-3'

(6). PAC86: 5' -CGC TGC GCG TGC GCA CAC GT-3'

(7). PAC87: 5' -CAG CAA GGG CAG AAC TGA AG-3'

(8). PAC88: 5' -GCT GGA CTT GTG GCA ATT AT-3'

(9). PAC89: 5' -TCA TGT CCC TAG AAA GGT GA-3'

及其同源序列

2、根据权利要求 1 所述的反义核酸, 其中所述同源序列与序列 1-9 有至少 70 % 同源性。

3、根据权利要求 1 所述的反义核酸, 其中所述同源序列与序列 1-9 有至少 80% 同源性。

4、根据权利要求 1 所述的反义核酸, 其中所述序列与序列 1-9 有至少 90% 同源性。

5、根据权利要求 1 所述的反义核酸序列及可药用载体的药物。

6、根据权利要求 1 所述的反义核酸用于制备抗肿瘤药物的用途。

说明书

类胰岛素生长因子受体基因的反义核酸的抑癌作用

本发明涉及抑制人体肿瘤细胞生长的反义核酸，具体地讲涉及抑制人体肿瘤细胞生长的反义核酸及含有所述反义核酸的组合物，以及将所述反义核酸用于制备抗肿瘤药物的用途。很多实验证明，I 型类胰岛素生长因子 (Insulin like Growth factor-I，以下简称 (IGF-1) 的受体在细胞生长调控和恶性转化方面具有十分重要的作用，并且它是细胞凋亡的一个重要的抑制剂。(Baserga, R. et. al. Cancer Res, 55: 249-252, 1995); (Macaulay, V. M. et. al Br. J. Cancer, 65:311-320, 1992)。IGF-1 受体是一个结合在细胞膜上的异型四聚体受体，带有内在的酪氨酸激酶活性。在很多种人类肿瘤中都有高水平的表达，在 SV40T 抗原、牛乳头瘤病毒激活 ras、raf、和 v-src 基因的转化中都需要它的表达。(Baserga, R. Cell, 79:927-930, 1994) 缺乏 IGF-1 受体的细胞延长其细胞周期动力学，IGF-1 受体缺乏小鼠显示出严重的生长减缓。(Sell, C, et, al Mol. cell. Biol. 14:3604-3612, 1994)，相反的。过量表达 IGF-1 受体的成纤维细胞在体外培养时对生长因子的需求降低，并且显示出对细胞凋亡敏感性的降低 (Sell. et. al. Mol, cell. Biol. 14:3604-3612, 1994)。当 IGF-1 受体被激活后，它传导的信号作用于最少以下四组效应物：(I) RS1, IRS2, Grb10 和 Shc. (Waters, S. et. al., Mol. Cel. Biol, 15:2791-2799, 1995) 其它下游效应物有 ras、raf-1 和丝



裂原激活蛋白激酶,另有证据显示,IGF-1受体是另外一条依赖于 ras 的信号通道的起始物 (Baserga, R. P. N. A.S. USA, 91:2191-2185, 1994), 因此,抑制 IGF-1 受体活性,可以抑制肿瘤细胞的生长,引起肿瘤细胞的分化。具有特异性抑制 IGF-1 受体活性的物质,可以发展成为治疗肿瘤的药物。

研究证明利用反义核酸抑制原癌基因的表达,可以达到抑制肿瘤细胞生长的目的。(Holt. et .al. Mol .cell. Biol, 1988, 8, 963-973) 反义核酸是一小段人工合成的 DNA 片段, 它的碱基排列顺序与人们选择作为阻断目标的基因的某一段互补, 依照碱基配对法则可以与存在于细胞质中的特定基因的信使核糖核酸 (mRNA) 结合, 阻断特定基因的 mRNA 翻译其编码的蛋白质分子。

在细胞内,一个拷贝的基因会产生 200—300 条 mRNA, 这 200—300 条 mRNA 会翻译出 10 万个有生物学功能的蛋白质分子。传统的药物一般是作用于具有生物学功能的蛋白质分子。而反义核酸是作用于编码产生的蛋白质分子的 mRNA, 所以与传统药物相比, 反义核酸药物的作用具有高效性。传统药物对其所作用的蛋白质分子的识别, 一般是识别其空间构型上的一两个位点, 特异性不易达到很高。而反义核酸是通过碱基配对的原理来识别其所作用的靶基因, 从理论上讲, 一条长度为 17 个碱基的反义核酸分子, 其碱基排列顺序在人体全部基因中即是唯一的, 所以, 长度超过十七个碱基的反义核酸分子, 其在人体基因中的结合位点也是唯一的。这就使反义核酸具有高度的特异性。毒理学研究也证明, 反义核酸在体内具有很低的毒性。因此, 运



用反义核酸，阻断某些肿瘤相关基因的表达，将会对肿瘤治疗具有相当大的意义。

本发明目的之一是提供一种反义寡聚脱氧核糖（DNA）或核糖（RNA）序列，其特征在于可特异性结合 IGF-1 受体基因 mRNA 的不同区域。

本发明的另一个目的是提供含有本发明反义核酸的药物组合物。

本发明的另一个目的是提供了本发明反义核酸用于制备抗肿瘤药物的用途。

本发明以 IGF-1 受体基因 mRNA 为攻击目标，设计了一系列反义核酸。采用亚磷酰胺固相合成法合成了相应的反义核酸分子，其长度均为 20 个核苷酸的残基。采用人体肺癌细胞株 A549 作为筛选体系，对合成的反义核酸进行初步筛选。筛选结果表明，其中 9 个寡聚反义核酸均具有不同程度的抑制人体肿瘤的生长特性，将它们分别定名为 Pac80、Pac81、Pac83、Pac84、Pac85、Pac86、Pac87、Pac88、Pac89，其中 Pac85 具有最高的抑制人体肿瘤细胞生长的活性。

具有抑制人体肿瘤细胞生长活性的 PAC 系列寡聚反义核酸碱基组成及顺序如下所示：

PAC80: 5' -TTA TTT GGG ATG AAA TTC CC-3' 20mer

PAC81: 5' -GGA GCC AGA CTT CAT TCC TT-3' 20mer

PAC83: 5' -TCC AGG ATC AGG GAC CAG TC-3' 20mer

PAC84: 5' -TGA GCA AAT TGC CCT TGA AG-3' 20mer

PAC85: 5' -CTC CAT GCG GTA AAT TTC GG-3' 20mer

PAC86: 5' -CGC TGC GCG TGC GCA CAC GT-3' 20mer

PAC87: 5' -CAG CAA GGG CAG AAC TGA AG-3' 20mer

PAC88: 5' -GCT GGA CTT GTG GCA ATT AT-3' 20mer

PAC89: 5' -TCA TGT CCC TAG AAA GGT GA-3' 20mer

设立阳性对照两个, 是 PAC14C 和 pac82, 序列如下,

PAC14c: 5' -TCC CGC CTG TGA CAT GCA TT-3' 20mer

PAC82: 5' -TCC TCC GGA GCC AGA CTT-3' 18mer

设立阴性对照一个, Pac23b 序列如下:

Pac23b: 5' -CAC GGT GCG TCG ACG CAC TA-3' 20mer

以上反义核酸除 Pac82 为 18 个核苷酸残基长度外, 其余均是长为 20 个核苷酸残基并经过硫代修饰的寡聚核苷酸, 攻击目标为 IGF-1 受体基因的信使核糖核酸 mRNA, 它们可在细胞质中与 IGF-1 受体基因的信使核糖核酸特异性结合, 阻止 IGF-1 受体的产生, 从而抑制了 IGF-1 受体的功能, 最终抑制了肿瘤细胞的生长。反义核酸是通过与目标基因的 mRNA 特异性杂交来发挥其生物学功能的, 从核酸杂交的特性看, RNA 与 mRNA 杂交的亲合力比 DNA 与 mRNA 杂交的亲合力要高, 从而在药用方面具有更大的价值, 但是由于目前合成 RNA 的成本远高于合成 DNA 的成本, 考虑到临床应用的成本要求, 目前作为临床应用实验的反义核酸药物均为寡聚脱氧核糖 (DNA), 合成的 RNA 成本有可能降低, 可能会在临床上采用反义寡聚核糖 RNA 或核糖 RNA 单体和脱氧核糖 DNA 单体嵌合相连而成的反义核酸作为药用。

反义核酸的生物学活性是序列特异性的, 互补于某一基因特定的



位点的反义核酸其互补的长度不同，生物学活性高低也不同，一般讲来，反义核酸与目标基因互补长一些。生物学活性会高，但较长的反义核酸其合成成本会高很多，所以作为药用的目的反义核酸。研究者均会同时考虑成本和药用活性，选取一个合适的长度，本发明中筛选出的反义核酸长度均为 20 个碱基。当然延长或缩短一至数个碱基而互补于同一基因位点的反义核酸，也会具有程度不同的相同生物学活性。同时互补于相同基因位点附近的反义核酸结合部位有不同程度的重叠，被认为具有程度不同的序列同源性，也会具有不同程度的相同生物学活性。

在人体内存在着大量的核酸外切酶，反义核酸若经过化学修饰会很快被降解，从而失去活性。反义核酸的化学修饰有很多种方法，常见的有硫代修饰反义核酸和 2-甲氧基修饰反义核酸等，目前硫代反义核酸的药理学、药代动力学、毒理学等与临床前研究是各种化学修饰反义核酸中研究的最为全面的，硫代反义核酸在体内可以有效地抵御核酸酶的降解，并且可以激发 RNA 酶 H 的活性，降解与之杂交的 mRNA 链，所以目前第一代临床试验应用的反义核酸均为硫代反义核酸。同时人们也在进行其它化学修饰的反义核酸的临床前及临床药物研究。所以某一特定序列的反义核酸可以通过不同的化学修饰作为化学组份不同的化合物，在临床上都具有药物活性。

综上所述，本发明所述的互补于 IGF-1 受体基因 mRNA 不同部位的反义核酸具有抑制人体肿瘤细胞株生长的特性，在肿瘤的治疗方面显示出诱人的前景。可以通过不同的化学修饰，采用不同的长度和不

同程度同源性的序列发展为具有临床应用价值的抗肿瘤药物。可以将本发明的核酸与药用载体结合，用于动物，包括哺乳动物和人。所述药用载体包括磷酸盐缓冲液（PH7.4）以及其他常用的载体和缓冲液。

图例说明：

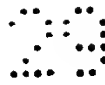
图 1：反义核酸 Pac 系列对 IGF 受体基因表达的抑制的核酸杂交（Northern blot）结果的照片。

将 A549 细胞株分为对照组（无处理），和反义核酸处理组，在含 10% 的胎牛血清 HAM'S S/F-12 培养液中培养，培养至细胞总数为 10 万时，将细胞培养液换成无血清培养液，除对照组外其余组加入 20ug/ml 的脂质体和终浓度为 800nM 的不同的反义核酸处理 5 小时，再换成普通培养基，恢复 24 小时，然后用 RNAzolB 提取细胞总 RNA 进行 IGF-1 受体基因 mRNA 的定量分析。用 IGF-1 受体基因的探针及 G3PDH（3-磷酸甘油醛脱氢酶）基因的探针与经电泳分离并转移到硝酸纤维膜上的细胞总 RNA 样品进行核酸杂交（Northern blot）分析，以 G3PDH 基因的 mRNA 作为内部参照，结果如图 1 所示。

图中两个（-）样品为无处理空白对照，23 号样品为阴性对照，82 号样品为阳性对照，其它为不同的 Pac 系列的反义核酸样品，18S、28S 为核糖体核糖核酸在电泳中的位置。图中可见 Pac 系列反义核酸对 IGF-1 受体 mRNA 的不同的抑制活性，以 Pac85 的抑制程度最高。

图 2：反义核酸 Pac 系列对人体肿瘤细胞株 A549 生长抑制

将 A549 细胞分为空白组、阳性对照组和 Pac 系列反义核酸处理



组，分别在含 10% 胎牛血清的 HAM's S/F-12 培养液中培养至细胞总数为 10 万。换成无血清培养液，除空白组外，其余组均分别加入 20ug/ml 的脂质体和终浓度为 800nM 的各自不同的反义核酸，处理 5 小时，换成正常含 10% 的胎牛血清的培养液，在 37℃ 继续培养。48 小时后进行细胞计数，用 MTT 法测定细胞生长程度。以空白组数值为 100%，作出细胞生长抑制图，从图中可见，黑色柱体代表针对 c-raf 基因的阳性对照反义核酸结果，深灰色柱体为阴性对照反义核酸结果，其余的浅灰色柱体为针对 IGF-1 受体基因的系列反义核酸结果，其中 Pac82 为针对 IGF-1 的受体基因的阳性对照反义核酸结果，图中的 Pac 系列反义核酸对细胞生长均有不同程度的抑制，其中，以 Pac85 抑制程度最高。

实施例 1：反义核酸攻击目标的确定及反义核酸的合成

选择 IGF-1 受体基因的不同位点。设计反义核酸分子。

使用美国 PE 公司应用生物系统部 (Applied Biosystems) 制造的 391-04 型 DNA-RNA 合成仪。以亚磷酰胺固相合成法合成硫代的所设计的反义核酸。

合成原料购自美国 Glen 公司，主要原料有：

四种二异丙基 β -氰乙基亚磷酰胺单体：腺苷 (A)、鸟苷 (G)、
胞苷 (C)、胸苷 (T)

四种控制孔径玻璃粉 (CPG) 固相合成柱 (A, G, C, T) 规模为 10 微摩尔。



盖帽物试剂:

盖帽试剂 A: 乙酸酐/ 二甲基吡啶/ 四氢呋喃

盖帽试剂 B: 1-甲基咪唑/ 四氢呋喃

硫代反应试剂:Beaucage 试剂/ 乙腈

脱三苯甲基试剂: 三氯乙酸/、二氯甲烷

液体溶剂: 乙腈和三氯甲烷

合成规模为 10 微摩尔, 碱基单体溶于无水乙腈中, 浓度为 100 毫摩尔, 其它试剂浓度及用量均按照仪器手册进行。

合成过程由仪器本身程序控制。

合成产物用浓氨水 (28%) 切割收集在密封耐压的玻璃瓶中, 于 550C 处理 15 小时脱去反义核酸分子上各种碱基保护基团和氨基保护基团。脱保护结束后挥发脱去大部分氨气冻干得白色粉末状粗品, 重新溶于缓冲液中, 用 Pharmacia Source 30 Q 层析柱及 AKTA 层析系统进行纯化。纯化样品用 G-15 分子筛葡聚糖凝胶层析柱除盐, 冻干, 得白色絮状反义核酸纯品。储存于 -30℃ 取少量样品进行如下分析:

- 1 用毛细管电泳法测其纯度及分子量
- 2 用高效液相层析法测其纯度
- 3 DNA 测序法测定其序列准确度
- 4 P_{31} NMR (核磁共振) 法测定其硫代程度

毛细管电泳法及高效液相法纯度分析结果显示 Pac 系列反义核酸纯品纯度均大于 90%。

序列测定证明 Pac 系列反义核酸序列与设计序列相同。

P₃₁ NMR 分析显示 Pac 系列反义核酸硫代率大于 98.5%

实施例 2 针对 IGF-1 受体的 Pac 系列反义核酸

在培养细胞中对 IGF-1 受体基因表达的抑制。

选用人体肺癌细胞株 A549 作为筛选实验用细胞株。参照 Miwa. W 等的文献 (Miwa, W, et, al. 1994 Biological Chemistry Lloppe-Seyler, 375(10):705-709). 将试验分组为: 空白无处理组, 阴性对照组, 阳性对照组, 反义核酸处理组每组细胞均接种在含 10% 胎牛血清的 HAM' s S/F-12 培养基中, 培养至细胞总数至 10 万。换为无血清的培养基, 除空白无处理组外其余组加入浓度为 20ug/ml 的脂质体和终浓度为 800nM 的不同种的反义核酸, 处理 5 小时, 然后换成正常培养基继续培养 24 小时, 用 RNAzolB 提取细胞总 RNA, 进行电泳分离, 用 IGF-1 受体基因的探针及 G3PDH (3-磷酸甘油醛脱氢酶) 基因的探针与经电泳分离并转移到硝酸纤维膜上的细胞总 RNA 样品进行核酸杂交 (Northern blot) 分析 (Sambrook. J., et. al Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2nd. ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). 以 G3PDH 基因的 mRNA 作为内部参照。核酸杂交的结果由 Pharmacia Image Master 扫描仪定量得出。以无处理对照组细胞的 IGF-1 受体 mRNA 含量为 100%, 结果如图 1 所示。图中, 两个 (一) 样品为无处理组, 23 号为阴性对照反义核酸, 82 号为针对 IGF-1 受体基因的阳性对照反义核



酸，其余为 Pac 系列反义核酸，从图中可清楚地看到反义核酸 Pac 系列对 IGF-1 受体基因的表达均具有不同程度的抑制活性，其中以 Pac85 的抑制活性为最高。

实施例 3 Pac85 的化学组成结构

参照 Nucleic Acids Research. 1995, Vol:24, No:2. P4219-4223 的方法对 Pac85 进行序列测定，结果如下：

5' -CTC CAT GCG GTA AAT TTC GG-3'

与设计序列一致，以毛细管电泳法测定 Pac85 的分子量，结果为 6400。与理论分子量 6393 相等。

Pac85 是 20 个脱氧核苷以磷酸硫酯键相连的反义核酸，其攻击目标是 IGF-1 受体基因的 mRNA。

实施例 4 MTT 法测定反义核酸 Pac 系列

对人体肿瘤细胞株 A549 生长的抑制

将 A549 细胞分为空白组、阳性对照组和 Pac 系列反义核酸处理组，分别在含 10% 胎牛血清的 HAM's S/F-12 培养液中培养至细胞总数为 10 万。换成无血清培养液，除空白组外，其余组均分别加入 20ug/ml 的脂质体和终浓度为 800nM 的各自不同的反义核酸，处理 5 小时，换成正常含 10% 的胎牛血清的培养液，在 37°C 继续培养。48 小时后进行细胞计数，用 MTT 法测定细胞生长程度。以空白组数值为 100%，作出细胞生长抑制图，从图中可见，黑色柱体代表针对 c-raf



基因的阳性对照反义核酸结果，深灰色柱体为阴性对照反义核酸结果，其余的浅灰色柱体为针对 IGF-1 受体基因的系列反义核酸结果，其中 Pac82 为针对 IGF-1 的受体基因的阳性对照反义核酸结果，图中的 Pac 系列反义核酸对细胞生长均有不同程度的抑制，其中，Pac85 抑制程度最高。

实施例 5 含反义核酸的药物组合物

作为动物（包括人类）体内给药的反义核酸药物组合物组成如下：

反义核酸 Pac85	10mg/ml
一水合磷酸一氢钠	1.73mg/ml
七水合磷酸氢二钠	14.33mg/ml
氯化钠	4.4mg/ml
注射用水	适量

本发明中其它几种反义寡聚核苷酸也采用同样配方。

勿用赘言，本发明的反义核酸具有很大的可能通过不同的化学修饰，采用不同的长度和不同程度同源性的序列发展为具有临床应用价值的抗肿瘤药物。单独使用或与其它药物联合使用进行肿瘤病的治疗，这些对在本领域的普通技术人员看来是显而易见的。



序列表

(1). 一般情况

(iii). 序列总数: 9

(2). 第 1 号序列情况

(i). 序列特性

(A). 长度: 20 碱基

(B). 类型: 核酸

(C). 链接: 单链

(D). 构型: 线性

(ii). 分子类型: 脱氧核糖

(iv). 是否反义核酸: 是

(xi). 序列说明: 第 1 号序列: Pac80

T T A T T T G G G A T G A A A T T C C C

20

(2). 第 2 号序列情况

(i). 序列特性

(A). 长度: 20 碱基

(B). 类型: 核酸

(C). 链接: 单链

(D). 构型: 线性

(ii). 分子类型: 脱氧核糖

(iv). 是否反义核酸: 是

(xi). 序列说明: 第 2 号序列: Pac81

GGAGCCAGAC TTCATTCCTT 20

(2). 第 3 号序列情况

(i). 序列特性

(A). 长度: 20 碱基

(B). 类型: 核酸

(C). 链接: 单链

(D). 构型: 线性

(ii). 分子类型: 脱氧核糖

(iv). 是否反义核酸: 是

(xi). 序列说明: 第 3 号序列: Pac83

TCCAGGATCA GGGACCAGTC 20

(2). 第 4 号序列情况

(i). 序列特性

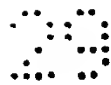
(A). 长度: 20 碱基

(B). 类型: 核酸

(C). 链接: 单链

(D). 构型: 线性

(ii). 分子类型: 脱氧核糖



(iv). 是否反义核酸: 是

(xi). 序列说明: 第 4 号序列: Pac84

TGAGCAAATT GCCCTTGAAG

20

(2). 第 5 号序列情况

(i). 序列特性

(A). 长度: 20 碱基

(B). 类型: 核酸

(C). 链接: 单链

(D). 构型: 线性

(ii). 分子类型: 脱氧核糖

(iv). 是否反义核酸: 是

(xi). 序列说明: 第 5 号序列: Pac85

CTCCATGCGG TAAATTTCGG

20

(2). 第 6 号序列情况

(i). 序列特性

(A). 长度: 20 碱基

(B). 类型: 核酸

(C). 链接: 单链

(D). 构型: 线性

(ii). 分子类型: 脱氧核糖



(iv). 是否反义核酸: 是

(xi). 序列说明: 第 6 号序列: Pac86

C G C T G C G C G T G C G C A C A C G T 20

(2). 第 7 号序列情况

(i). 序列特性

(A). 长度: 20 碱基

(B). 类型: 核酸

(C). 链接: 单链

(D). 构型: 线性

(ii). 分子类型: 脱氧核糖

(iv). 是否反义核酸: 是

(xi). 序列说明: 第 7 号序列: Pac87

C A G C A A G G G C A G A A C T G A A G 20

(2). 第 8 号序列情况

(i). 序列特性

(A). 长度: 20 碱基

(B). 类型: 核酸

(C). 链接: 单链

(D). 构型: 线性

(ii). 分子类型: 脱氧核糖



(iv). 是否反义核酸: 是

(xi). 序列说明: 第 8 号序列: Pac88

GCTGGACTTG TGGCAATTAT

20

(2). 第 9 号序列情况

(i). 序列特性

(A). 长度: 20 碱基

(B). 类型: 核酸

(C). 链接: 单链

(D). 构型: 线性

(ii). 分子类型: 脱氧核糖

(iv). 是否反义核酸: 是

(xi). 序列说明: 第 9 号序列: Pac89

TCAATGTCCCT AGAAAGGTGA

20

98.05.29

Pac 系列反义核酸抑制 IGF-1 受体基因表达

IGF-1 受体反义核酸

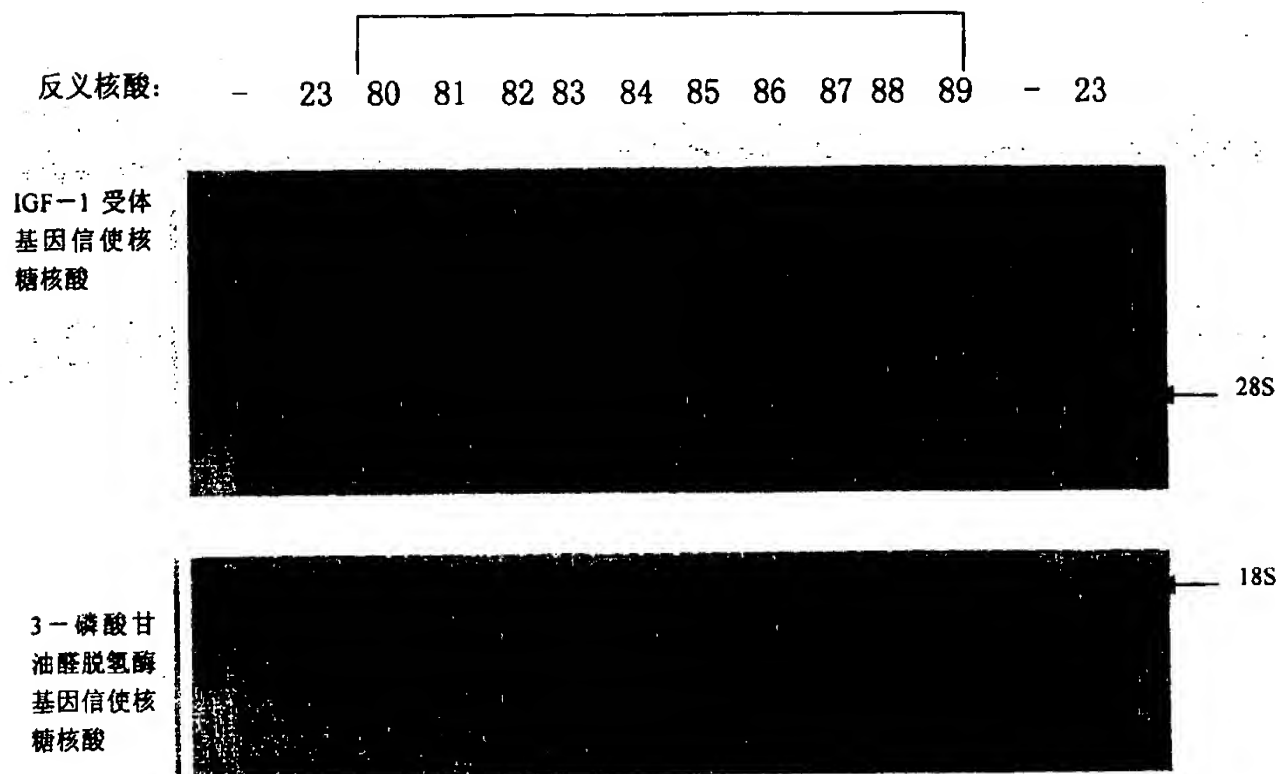


图 1

反义核酸 Pac 系列对人体肿瘤细胞株

A549 生长的抑制 (MTT 法)

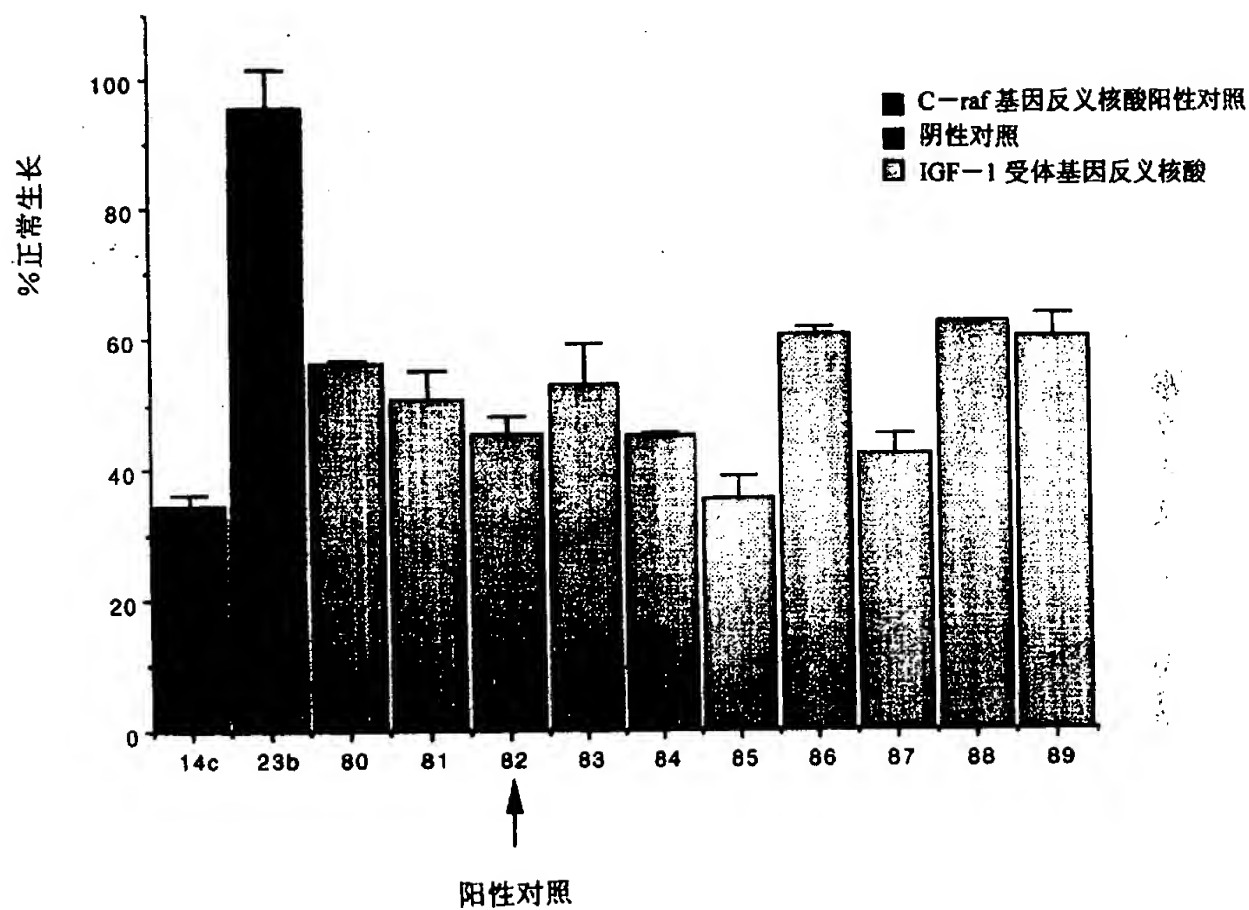


图 2